

Diversidad genética en pacientes embarazadas seropositivas para el VIH-1 en la comunidad balear

C. Santos¹, M^a D. Bea², V. Candia², C. Vidal¹

1- Unidad de secuenciación. Hospital Universitario Son Espases

2- Servicio de Microbiología. Microbiología Molecular. Hospital Universitario Son Espases

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio es analizar la prevalencia de los diferentes subtipos del VIH-1 en pacientes gestantes de la Comunidad Balear.

Métodos: Se incluyeron de forma retrospectiva todas las gestantes seropositivas para el VIH-1 genotipadas en el Servicio de Microbiología y la Unidad de Secuenciación del Hospital Universitario Son Dureta, entre los años 2005 y 2010, en total 45. Durante el seguimiento se realizó la cuantificación de la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4⁺ y el genotipado mediante la secuenciación el gen *pol* del VIH-1. Las secuencias FASTA obtenidas fueron analizadas con la plataforma informática HIVDB Program de la Universidad de Stanford.

Resultados: De las 45 gestantes incluidas en el estudio, 26 (57,8%) presentaban un subtipo B y 19 (42,2%) un subtipo no B, siendo más frecuentes las formas recombinantes (CRFs) (68,8%).

Conclusión: La introducción de subtipos no B en la comunidad balear es importante y el análisis de estas variantes en la población embarazada es de gran utilidad para monitorizar la entrada en nuestro país de variantes nuevas con implicaciones epidemiológicas y terapéuticas.

Palabras clave: Diversidad genética, subtipos de VIH-1, gestantes

Abstract

Aim: The aim of this study was to assess the prevalence of HIV-1 subtypes in pregnant women in the Balearic Community.

Methods: We retrospectively included all HIV-1 seropositive pregnant women genotyped in the Service of Microbiology and the Sequencing Unit of the University Hospital Son Dureta between 2005 and 2010 (n=45). During the follow-up, quantification of viral load, CD4⁺ T lymphocytes count and genotyping of HIV-1 through sequencing of *pol* gene, were performed. FASTA sequences were analyzed using the HIVDB Program of the Stanford University.

Results: From a total of 45 HIV-1 seropositive women included, 26 (57.8%) were infected with clade B HIV-1 whereas in the remaining 19 (42.2%), sequencing studies shown a non-B viral subtype, being the circulating recombinant forms (CRFs) the most frequent (68.8% of the non-B subtypes).

Conclusion: HIV-1 non-B subtypes have spread in our community. Analysis of these variants in the pregnant woman population could be a useful tool for monitoring the entry in our community of new forms with epidemiological and therapeutic consequences.

Key words: Genetic diversity, HIV-1 subtypes, pregnant women

Correspondencia

Carne Vidal - Unidad de Secuenciación. Modulo J. Planta +2. Espacio 650
Hospital Universitari Son Espases - Ctra. de Valldemosa 79
Palma de Mallorca - 07010
mariac.vidal@ssib.es - 871205050 (ext. 65483)

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), al igual que otros virus con ARN, presenta alta variabilidad genética *in vivo*¹. Este hecho está mediado por mecanismos moleculares que incluyen mutaciones, recombinaciones y frecuentes deleciones e inserciones². Esta evolución ha dado lugar a tres grandes grupos: M, O y N. Los virus más prevalentes pertenecen al grupo M, y se subdividen en nueve subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K)³. Se ha observado que algunas variantes del VIH-1 no pueden ser consideradas como subtipos, siendo lo que se conoce como formas circulantes recombinantes (CRF), de las que, hasta el momento, se conoce al menos cuarenta y tres. Cuando estos variantes recombinantes se detectan en individuos aislados se denominan formas recombinantes únicas (URF)⁴.

El subtipo predominante en países industrializados como España es el subtipo B. El resto de subtipos distintos del B y las formas recombinantes son mayoritarios en países en vías de desarrollo, sobre todo en África subsahariana, donde se acumula el mayor porcentaje de los más de 36 millones de infectados⁵ (Fig.1).

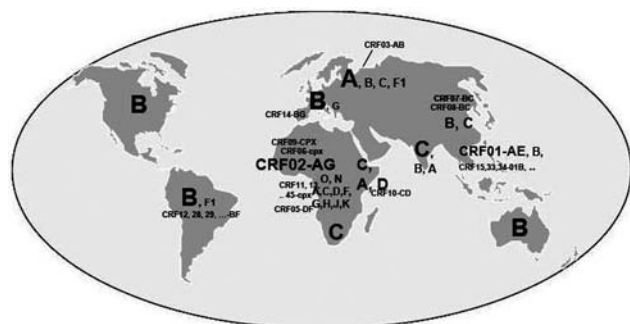


Figura 1. Distribución mundial de los diferentes subtipos del VIH-1

La diversidad genética del VIH-1 supone un desafío tanto desde el punto de vista de salud pública como por sus implicaciones clínicas, teniendo en cuenta que en la última década la prevalencia de la infección por virus del subtipo no B se ha incrementado en países como Francia, Bélgica, España y Suiza⁶⁻⁹, en gran parte debido al aumento de la inmigración proveniente de áreas endémicas del VIH-1¹⁰.

Por estos motivos, realizamos este estudio para conocer la prevalencia de los diferentes subtipos en una población multiétnica de pacientes embarazadas infectadas por el VIH-1, dado su interés como población centinela, por la oportunidad que ofrece la ges-

tación de controlar a pacientes que, de otra forma, podrían permanecer al margen del sistema sanitario.

Pacientes y métodos

Pacientes

Se incluyeron de forma retrospectiva en el estudio todas las gestantes seropositivas para el VIH-1 procedentes de los diferentes hospitales de la Comunidad Balear, estudiadas en el Servicio de Microbiología y la Unidad de Secuenciación del Hospital Universitario Son Dureta, entre los años 2005 y 2010, en total 45. Durante el seguimiento se realizó la cuantificación de la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4+ y el genotipado para la determinación de mutaciones de resistencia a los fármacos antirretrovirales y para la tipificación del virus infectante.

Métodos

Se extrajeron dos muestras de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA). Un tubo se envió al laboratorio de Inmunología para la determinación de los linfocitos CD4+ y el otro al de Microbiología, donde se separó el plasma, que fue congelado a -80°C hasta su posterior utilización. La determinación de la carga viral se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular del Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta, mediante la técnica Versant[®] HIV-1 RNA 3.0 (Siemens Healthcare Diagnostics, Barcelona). La determinación de los linfocitos T CD4+ se realizó en el laboratorio de inmunología del Hospital Son Dureta mediante la técnica de la cuantificación de la subpoblación celular T CD4+, mediante citometría de flujo (FC 500 Beckman Coulter).

El genotipado de las muestras se realizó en la Unidad de Secuenciación del Hospital Son Dureta. En primer lugar se realizó la extracción de ARN viral con el sistema comercial QIAamp[®] Viral RNA Mini-Kit (Izasa, Barcelona).

Una vez extraído el ARN se hizo la retrotranscripción y posterior secuenciación con el sistema Trugene[®] HIV-1 Genotyping Test (Siemens) y, por último, realizamos la secuenciación del gen *pol* del virus con el secuenciador Long-Read Tower (Opengene System), también de Siemens. El análisis filogenético las secuencias obtenidas se realizó con la plataforma informática de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Subtipo B (n=26)	Subtipo no B (n= 19)							
		CRF02_AG	CRF06_CPX	CRF01_AE	CRF12_BF	G	F	C
España	21 (80,8%)							1 (5,2%)
África Subsahariana	2 (7,7%)	9 (47,3%)	2 (10,5%)			3 (15,8%)		
Sudamérica	1 (3,8%)				1 (5,2%)			
Europa del este	2 (7,7%)			1 (5,2%)			2 (10,5%)	

Tabla I : Distribución de subtipos del VIH-1 según procedencia

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 17.0. En general, se ha realizado un análisis no paramétrico de los datos. Para las variables categóricas del estudio se describieron las frecuencias absolutas o relativas. En el caso de variables continuas se tipificaron mediante el cálculo de la mediana y el rango.

Las diferencias en las variables cuantitativas (edad, carga viral y número de CD4+) en función del genotipo se analizaron mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. La asociación de las variables categóricas según el genotipo se estudió con la prueba de la chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher, en función de la distribución estadística de los datos. Todos los valores de *p* reportados son de dos colas y se consideran valores significativos cuando *p*<0,05.

Resultados

Cuarenta y cinco mujeres embarazadas, con una mediana de edad de 29 años (17-42) fueron incluidas en el estudio, de las cuales 22 (48,9%) eran españolas y 23 (51,1%) eran extranjeras. En el momento del análisis, la mediana de la carga viral era de 3,8 log¹⁰ copias ARN/mL (2,9–5,3 log¹⁰ copias ARN/mL) y la mediana de linfocitos T CD4+ de 298 cel/L (25-1640 cel/ μ L).

En el análisis filogenético del gen *pol* del VIH-1 se determinó que 26 gestantes (57,8%) presentaban el subtipo B y 19 (42,2%) un subtipo no B (tabla 1). Dentro de las gestantes con subtipo B, 21 (80,8%) eran españolas, 2 (7,7%) africanas, 2 (7,7%) de Europa del Este y 1 de América latina (3,8%). Respecto a los subtipos no B, los más frecuentes

correspondieron a las formas recombinantes CRFs [un total de 13 (68,4%)], de las cuales 9 (47,3%) eran CRF02_AG, 2 (10,5 %) CRF06_CPX, 1 (5,5%) CRF12_BF y 1 (5,5%) CRF01_AE. La procedencia de las pacientes en las que se detectaron CRFs era, en su mayoría, el África subsahariana. De los otros subtipos no B detectados, 3 (15,8%) pertenecían al subtipo G y correspondieron también a mujeres africanas, 2 (10,5%) eran del subtipo F y se detectaron en mujeres precedentes de países del este europeo. Tan sólo una gestante, que presentaba un subtipo C (5,2%), era de origen español

En el momento del análisis no se observaron diferencias respecto a la edad, carga viral o linfocitos CD4+ en función de si las gestantes presentaban un subtipo B o no. Sin embargo, al comparar los niveles de carga viral y linfocitos CD4+ entre gestantes en tratamiento antirretroviral y gestantes que no lo habían recibido (*naïves*), se observa una tendencia a presentar cifras más bajas de linfocitos CD4+ y cargas virales más elevadas en el grupo de gestantes con subtipo no B sin tratamiento (*p*=0,052 y 0,22, respectivamente), la mayoría de las cuales eran de procedencia africana (tabla 2). Respecto al tratamiento, del total de gestantes subtipadas 20 eran *naïves* (44,4%) y 25 estaban tomando tratamiento antirretroviral.

Discusión

El subtipado del VIH-1 es una importante herramienta tanto para describir nuevos aislados como para monitorizar los cambios geográficos en la epidemia global por el VIH-1. Conocer cómo se distribuyen los subtipos no B en una determinada área geográfica nos da una información importante acerca de las características epidemiológicas y de las estrategias de prevención.

	Total grupo			Sin tratamiento	
	Carga viral (log ₁₀ ARN copias/mL)	CD4+ (células/ μ L)	% recibiendo TARGA (n)	Carga viral (log ₁₀ ARN copias/mL)	CD4+ (células/ μ L)
Subtipo B	3,8 (2,9-5,3)	345 (35-1640)	54% (14)	3,9 (2,9-4,9)	374 (85-1440)
Subtipo no-B	4,1 (3-5,2)	275 (25-799)	58% (11)	4,4 (3-5,2)	246 (55-382)
p	0,52	0,09	0,79	0,22	0,052

Tabla II. Niveles de carga viral y de linfocitos T CD4+

Una de las características observadas en nuestro estudio es la elevada prevalencia de subtipos no B detectados en la población gestante (42,2%), la mayoría formas recombinantes CRFs presentes en mujeres procedentes de África subsahariana. Este hecho requiere una reflexión: bajo esta perspectiva, la población de gestantes no nos serviría como representativa de la distribución de los subtipos en la población general, ya que existen un evidente sesgo de selección (es más probable que una mujer de procedencia africana quede al margen del sistema sanitario en tanto no sea gestante, lo que no ocurriría con otros grupos poblacionales). Además, algunos estudios recientes estiman la prevalencia actual de subtipos no B entre un 15% y un 20%^{11, 12} en pacientes con infección reciente. Sin embargo, esta población sí que tiene un importante papel para la detección de variantes virales distintas de subtipo B que, de otra forma, no se detectarían, si tenemos en cuenta que la gran parte de estos subtipos están presentes en población inmigrante que, por sus especiales características socioeconómicas, pueden quedar fuera del sistema sanitario pero que, desde el punto de vista epidemiológico podrían diseminarlos en la población.

Aunque este estudio presenta una serie de limitaciones respecto al número de gestantes incluidas en él, sí que es interesante resaltar que en el grupo de pacientes con subtipo no B sin tratamiento antirretroviral mostraron una tendencia a presentar niveles de carga viral más elevados y un número de linfocitos CD4+ más bajos que las gestantes con subtipo B *naïves*. A pesar de que no encontramos diferencias significativas, estos datos nos sugieren una falta de información y control en las pacientes extranjeras, sobre todo aquellas que proceden del África subsahariana, que representan un 73% del total de gestantes con subtipos no B no tratadas, datos similares han sido descritos por Akouamba et al¹³.

En conclusión, este estudio demuestra que los subtipos no B del VIH-1 se han introducido en nuestra

comunidad y que el análisis de estas variantes en la población embarazada es de gran utilidad para monitorizar la entrada de variantes nuevas en nuestro país y adoptar las medidas de control pertinentes.

Bibliografía

- 1.- Domingo E, Quiñones-Mateu ME, Holguín A, Soriano V, Gutiérrez-Rivas M, Menéndez L. Variabilidad en HIV. SEISIDA 1997; 8: 180-182.
- 2.- McCutchan E, Salminen MO, Carr JC, Burke DS. HIV genetic diversity. XI International Conference on AIDS 1996.
- 3.-Rivas P, Holguín A, Ramírez de Arellano E, Muñoz-Almagro C, Delgado R, Ortiz de Lejarazu R, et al. Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24: 29-33.
- 4.- Holguín A. Clasificación del virus de la inmunodeficiencia humana. En: IX Curso de Biología Molecular para Clínicos 2008. Barcelona: Permanyer; 2008.
- 5.- Reunión de Alto Nivel sobre SIDA 2008. Asamblea General, Naciones Unidas, Nueva York. Junio 2008.
- 6.- Vallet S, Legrand-Quillien MC, Roger C, Bellein V, Perfezou P, de Saint-Martin L, et al. HIV-1 genetic diversity in Western Brittany, France. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002; 34: 65-71.
- 7.- Fransen K, Buve A, Nkengasong JN, Laga M, van der Groen G. Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet*. 1996; 347: 1403.
- 8.- Thomson MM, Delgado E, Manjon N, Ocampo A, Villahermosa ML, Marino A, et al. HIV-1 genetic diversity in Galicia, Spain: BG intersubtype recombinant viruses are circulating among injecting drug users. *AIDS*. 2001; 15: 509-516.
- 9.- Boni J, Pyra H, Gebhardt M, Perrin L, Burgisser P, Matter L, et al. High frequency of non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 infections in Switzerland. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999; 22: 174-179.

10.- Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3: 22-27.

11.- García F, Pérez-Cachafeiro S, Guillot V, Álvarez M, Pérez-Romero P, Pérez-Eliás MJ et al. Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CÓRIS). *Antiviral Res* 2011; 91:150-153.

12.- Romero A, Sued O, Puig T, Esteve A, Pumarola, Casabona J et al. Prevalence of transmitted antiretroviral resistance and distribution of HIV-1 subtypes among patients with recent infection in Catalonia (Spain) between 2003 and 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(7):482-489.

13.- Akouamba BS, Viel J, Charest H, Merindol N, Samson J, Lapointe N, et al. HIV-1 genetic diversity in antenatal cohort, Canada. *Emerging Infectious Disease* 2005; 11(8):1230-1234.

